



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108697662 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680080246.1

(22)申请日 2016.12.09

(30)优先权数据

15199512.3 2015.12.11 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/DK2016/050424 2016.12.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/097311 EN 2017.06.15

(71)申请人 奥胡斯大学

地址 丹麦奥胡斯

(72)发明人 T·H·佩德森 M·B·斯高夫

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 31/00(2006.01)

A61K 31/165(2006.01)

A61K 31/4192(2006.01)

A61K 31/53(2006.01)

A61P 21/02(2006.01)

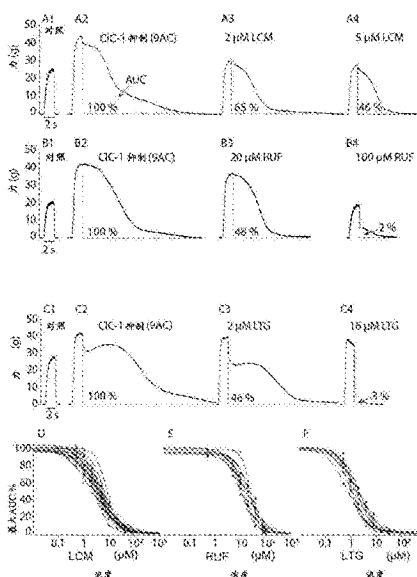
权利要求书5页 说明书17页 附图8页

(54)发明名称

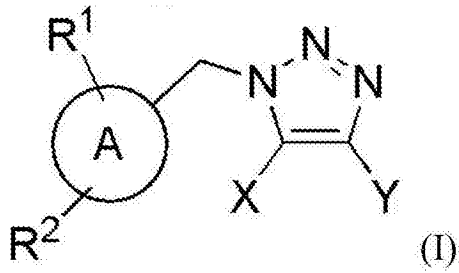
用于治疗肌强直的卢非酰胺

(57)摘要

本发明涉及用于治疗肌强直,例如先天性肌强直,先天性副肌强直和肌强直性营养不良的卢非酰胺(或其活性衍生物)。本发明还涉及包含卢非酰胺(或其活性衍生物)和拉莫三嗪(或其活性衍生物)的组合性组合物,其用于用作药物。



1. 一种组合物,其包含根据式(I)的卢非酰胺或其活性衍生物:



其中,

-A是芳基或杂芳基,

-R¹和R²独立地选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺,

-X选自:氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺,

-Y选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

该组合物用于

-治疗肌强直;和/或

-治疗或减轻与肌强直相关的症状;

其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道。

2. 根据权利要求1的用于所述用途的组合物,其中A是苯基,并且R¹和R²优选在所述苯基的2-和6-(邻)位。

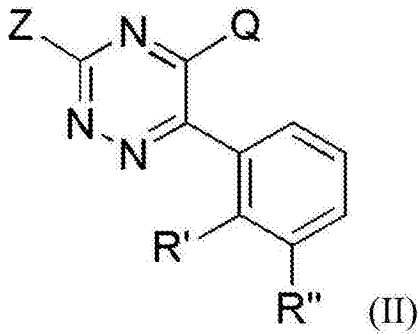
3. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的组合物,其中R¹和R²是氟;和/或X选自:氢、卤素、甲基和胺,优选氢;和/或Y是羧酰胺,优选-C(O)NH₂。

4. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的组合物,其中该式(I)的化合物是卢非酰胺。

5. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的组合物,其中该肌强直选自:先天性肌强直、先天性副肌强直、高血钾性麻痹、低血钾性麻痹以及肌强直性营养不良。

6. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的组合物,其中所述症状选自:非自发肌肉收缩、肌肉僵硬、运动停滞、自主收缩后肌肉松弛延迟(肌强直)、肥大(增大)、一过性无力、肌肉损伤、肌肉萎缩、肌肉消耗以及痉挛,优选肌肉消耗。

7. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的组合物,其中该组合物还包含根据式(II)的拉莫三嗪或其活性衍生物



其中，

-Z和Q独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

-R' 和R'' 独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道。

8. 根据权利要求7的用于所述用途的组合物，其中Z和Q二者均是胺，和/或R' 和R'' 二者均是氯。

9. 根据权利要求7或8的用于所述用途的组合物，其中该式(I)的化合物是卢非酰胺，并且该式(II)的化合物是拉莫三嗪。

10. 根据权利要求7-9中任一项的用于所述用途的组合物，其中当给予权利要求7-9中任一项的组合物时实现的Nav1.4电压门控钠通道的组合抑制和/或调节大于当分开给予该式(I)的化合物和该式(II)的化合物时实现的抑制和/或调节的总和。

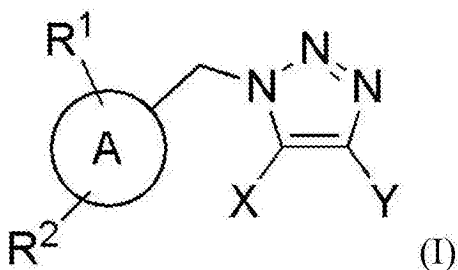
11. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的组合物，其中以治疗有效量提供所述组合物。

12. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的组合物，其中以范围为10-7200mg/天例如400-3600mg/天、例如100-2100mg/天或例如1600-7200mg/天的每日剂量提供卢非酰胺或其活性衍生物。

13. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的组合物，其还包含药学上可接受的辅料、稀释剂和/或载体。

14. 一种组合物，其包含

-根据式(I)的卢非酰胺或其活性衍生物：



其中，

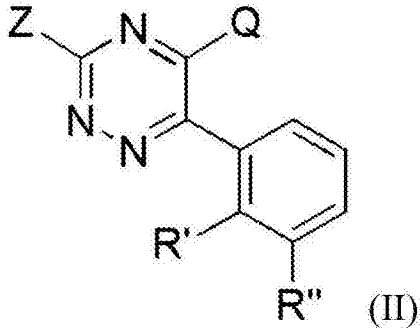
-A是芳基或杂芳基，

-R¹和R²独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，

-X选自：氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，

-Y选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，以及

根据式 (II) 的拉莫三嗪或其活性衍生物



其中，

-Z和Q独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

-R' 和R'' 独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道；

其中该组合物包含

-治疗有效量的根据式 (I) 的卢非酰胺或其活性衍生物；以及

-治疗有效量的根据式 (II) 的拉莫三嗪或其活性衍生物；

其中所述治疗有效量足以治疗肌强直或者治疗或减轻与肌强直相关的症状。

15. 根据权利要求14的组合物，其还包含药学上可接受的辅料、稀释剂和/或载体。

16. 根据权利要求14-15中任一项的组合物，其包含

-5-7200mg的根据式 (I) 的卢非酰胺或其活性衍生物；以及

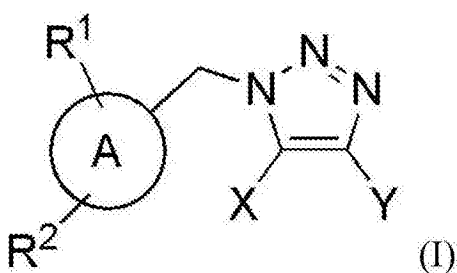
-5-800mg的根据式 (II) 的拉莫三嗪或其活性衍生物。

17. 根据权利要求14-16中任一项的组合物，其用作药物。

18. 根据权利要求14-17中任一项的组合物或根据权利要求19的用于所述用途的组合物，其中该式 (I) 的化合物是卢非酰胺，并且该式 (II) 的化合物是拉莫三嗪。

19. 一种组合物，其包含

-根据式 (I) 的卢非酰胺或其活性衍生物：



其中，

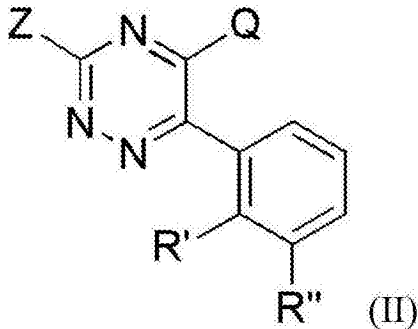
-A是芳基或杂芳基，

-R¹和R²独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，

-X选自：氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，

-Y选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，以及

根据式 (II) 的拉莫三嗪或其活性衍生物



其中，

-Z和Q独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

-R' 和R'' 独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道；

该组合物用作药物。

20. 根据权利要求19的组合物，其用于

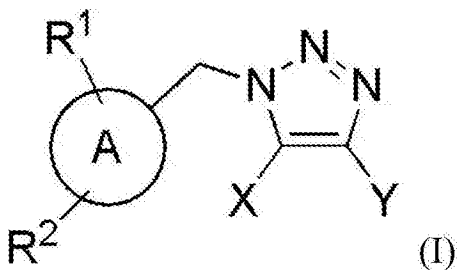
-治疗肌强直；和/或

-治疗或减轻与肌强直相关的症状。

21. 根据权利要求20-21中任一项的用于所述用途的组合物，其中该式 (I) 的化合物是卢非酰胺，并且该式 (II) 的化合物是拉莫三嗪。

22. 一种多组分试剂盒，其包含

第一组合物，该第一组合物包含根据式 (I) 的卢非酰胺或其活性衍生物：



其中，

-A是芳基或杂芳基，

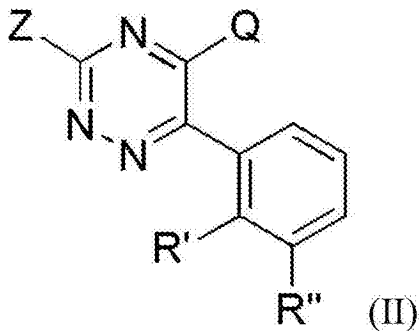
-R¹和R²独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，

-X选自：氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛

以及任选经取代的胺,

-Y选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,以及

第二组合物,该第二组合物包含根据式(II)的拉莫三嗪或其活性衍生物



其中,

-Z和Q独立地选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

-R' 和R'' 独立地选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道,

该多组分试剂盒用于治疗肌强直;和/或治疗或减轻与肌强直相关的症状。

23. 根据权利要求24的用于所述用途的多组分试剂盒,其中该式(I)的化合物是卢非酰胺,并且该式(II)的化合物是拉莫三嗪。

24. 根据权利要求22-23中任一项的多组分试剂盒,其包含

-5-7200mg的根据式(I)的卢非酰胺或其活性衍生物;以及

-5-800mg的根据式(II)的拉莫三嗪或其活性衍生物。

用于治疗肌强直的卢非酰胺

发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗肌强直的卢非酰胺或其衍生物。具体而言,本发明涉及包含卢非酰胺或其衍生物的药物组合物,该药物组合物用于治疗先天性肌强直、高血钾性麻痹、低血钾性麻痹、先天性副肌强直以及肌强直性营养不良。

[0002] 发明背景

[0003] 先天性肌强直和肌强直性营养不良是与ClC-1离子通道功能丧失相关联的骨骼肌病症。ClC-1通道功能障碍导致肌纤维的膜电导大幅下降,进而导致肌纤维过度兴奋。这种过度兴奋引入自发性动作电位激发,触发肌肉的自发性收缩和延迟的松弛,这是肌强直的临床标志。

[0004] 为减轻肌强直症状,抗肌强直治疗一般集中在通过电压门控钠通道(NaV1.4)阻碍钠电流上,这些通道负责产生肌纤维动作电位的上行程。在药理学上,这种Nav1.4阻滞已经用慢心律(Mexilitine)或妥卡尼(Tocainide)实现。然而,这两种药物均对肌强直有可变的影响,并且它们由于其不良副作用已退出一些国家的市场。因此,目前没有FDA批准的先天性肌强直治疗物。由此可清晰可见,尽管Nav1.4是抗肌强直治疗中的有效靶标,但仍需要用于抑制或调节这些通道的新药物途径。

[0005] EP 0199262 (A2) 公开了氟化的苄基三唑化合物和制备此类化合物的方法。

[0006] 因此,改进的肌强直治疗将是有利的,并且特别是对与肌强直相关的症状的更有效和/或可靠的治疗将是有利的。

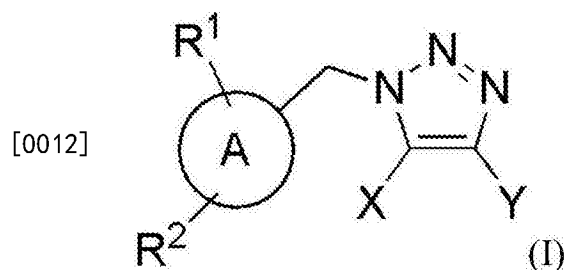
[0007] 发明概述

[0008] 本研究使用临床批准的抗惊厥剂钠通道调节药物来测试它们能否大鼠和人体肌肉中的肌强直。确切地,本研究探讨了是否可以通过以下方式降低肌强直:i) Nav1.4活化曲线中的去极化转变, ii) 慢失活曲线中的超极化转变,或促进进入该状态,以及 iii) 失活曲线中的超极化转变。

[0009] 本研究显示拉科酰胺(LCM)、卢非酰胺(RUF)和拉莫三嗪(LTG)均能够降低ClC-1受抑制的大鼠和人体肌肉中的肌强直性收缩。重要的是,这些抗肌强直作用是在临床上接受的浓度下观察到的。并且LTG和RUF的组合显示出明显的协同抗肌强直作用。

[0010] 因此,本发明的一个目的是提供用于治疗肌强直的药物/组合物。

[0011] 因此,本发明的一个方面涉及一种(药物)组合物,其包含根据式(I)的卢非酰胺或其活性衍生物:



[0013] 其中,

[0014] -A是芳基或杂芳基，

[0015] -R¹和R²独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，任选地R¹和/或R²是不存在的，

[0016] -X选自：氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，

[0017] -Y选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

[0018] 该组合物用于

[0019] -治疗肌强直；和/或

[0020] -治疗或减轻与肌强直相关的症状；

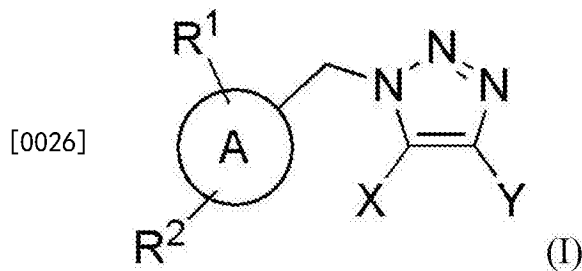
[0021] 其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道。在优选的实施方案中，式(I)的化合物是卢非酰胺。

[0022] 本发明的第二方面涉及一种包含卢非酰胺的(药物)组合物，其用于治疗肌强直；和/或治疗或减轻与肌强直相关的症状。

[0023] 在另一方面，本发明涉及一种包含拉科酰胺(LCM)或拉莫三嗪(LTG)的(药物)组合物，其用于治疗肌强直；和/或治疗或减轻与肌强直相关的症状。优选地，症状是肌肉损伤和/或肌肉消耗。

[0024] 本发明的另一方面涉及(组合性)组合物，其包含

[0025] -根据式(I)的卢非酰胺或其活性衍生物：



[0027] 其中，

[0028] -A是芳基或杂芳基，

[0029] -R¹和R²独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，任选地R¹和/或R²不存在，

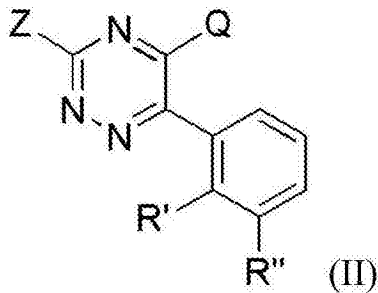
[0030] -X选自：氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，

[0031] -Y选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

[0032] 以及

[0033] 根据式(II)的拉莫三嗪或其活性衍生物

[0034]



[0035] 其中,

[0036] -Z和Q独立地选自:卤素,C₁-C₅烷基,C₂-C₅烯基,C₂-C₅炔基,任选经取代的酮,任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

[0037] -R'和R''独立地选自:卤素,C₁-C₅烷基,C₂-C₅烯基,C₂-C₅炔基,任选经取代的酮,任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,任选地R'和/或R''是不存在的,

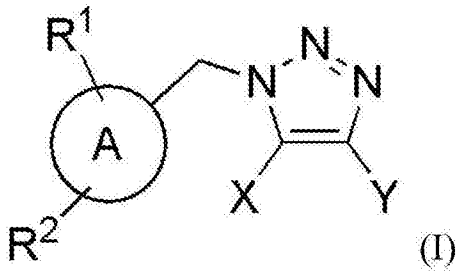
[0038] 其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道。

[0039] 在一个优选的实施方案中,式(I)的化合物是卢非酰胺,并且具有式(II)的化合物是拉莫三嗪。

[0040] 本发明的又另一方面提供多组分试剂盒,其包含

[0041] 第一组合物,该第一组合物包含根据式(I)的卢非酰胺或其活性衍生物:

[0042]



[0043] 其中,

[0044] -A是芳基或杂芳基,

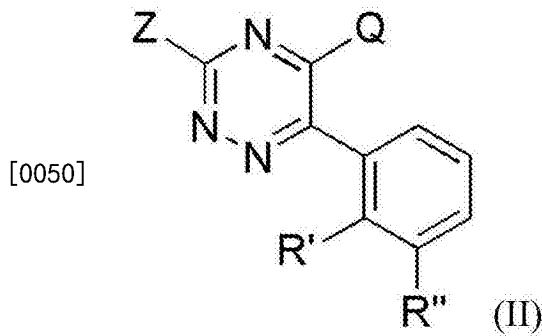
[0045] -R¹和R²独立地选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺,任选地R¹和/或R²是不存在的,

[0046] -X选自:氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺,

[0047] -Y选自:卤素,C₁-C₅烷基,C₂-C₅烯基,C₂-C₅炔基,任选经取代的酮,任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

[0048] 以及

[0049] 第二组合物,该第二组合物包含根据式(II)的拉莫三嗪或其活性衍生物



[0051] 其中,

[0052] -Z和Q独立地选自:卤素,C₁-C₅烷基,C₂-C₅烯基,C₂-C₅炔基,任选经取代的酮,任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

[0053] -R'和R''独立地选自:卤素,C₁-C₅烷基,C₂-C₅烯基,C₂-C₅炔基,任选经取代的酮,任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,任选地R¹和/或R²是不存在的,

[0054] 其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道,

[0055] 用于治疗肌强直;和/或治疗或减轻与肌强直相关的症状。在一个优选的实施方案中,式(I)的化合物是卢非酰胺,并且具有式(II)的化合物是拉莫三嗪。

[0056] 另一方面涉及一种对需要治疗肌强直和/或治疗或减轻与肌强直相关的症状的受试者进行治疗的方法,该方法包括将根据本发明的组合物给予该受试者。

[0057] 附图简述

[0058] 图1

[0059] 图1显示拉科酰胺、卢非酰胺和拉莫三嗪降低大鼠比目鱼肌中的肌强直。A1、B1和C1均显示在代表性的分离的大鼠比目鱼肌中对0.2ms脉冲的持续2s的15Hz刺激的力响应。A2、B2和C2显示在用9-AC孵育以阻断C1C-1通道并且这引入了类似于先天性肌强直和肌强直性营养不良的肌强直之后,对该刺激的力响应。A2中的虚线指示刺激停止,并且该线上方的力积分被量化为肌强直响应(尾AUC)。A3和A4分别显示在添加2μM和5μM LCM后的肌强直响应。类似地,B3和B4显示对20μM和100μM RUF的响应,并且C3和C4显示在2μM和16μM LTG的存在下的力响应。D显示来自个体肌肉的AUC,绘制为在LCM浓度范围下的最大AUC%(A2、B2、C2),对于每块肌肉(n=20)具有3参数S形拟合。E和F分别显示RUF(n=10)和LTG(n=10)的相似数据。

[0060] 图2

[0061] 图2显示拉科酰胺、卢非酰胺和拉莫三嗪降低分离的人腹直肌中的肌强直。A1显示来自在15Hz以0.2ms脉冲刺激2s的一束人腹肌的力响应。当在大鼠肌肉中时,肌强直是用9-AC诱导,并从如从刺激停止到力恢复到基线所确定的AUC来量化。A2显示对用9-AC阻断C1C-1通道的力响应。A3显示在9AC和20μM RUF的存在下对刺激的响应,并且A4显示在9AC和80μM RUF的存在下的响应。B显示来自单独肌束的作为在LCM浓度范围下最大AUC%(A2)的AUC,对于每个肌束(n=5)具有3参数S形拟合。C和D分别显示RUF(n=4)和LTG(n=6)的类似数据。

[0062] 图3

[0063] 图3显示了LTG和RUF的协同效应。A1显示了在分离的大鼠比目鱼肌中对0.2ms脉冲的持续2s的15Hz刺激的力响应。A2显示在用9-AC孵育以阻断C1C-1通道(引入了肌强直)之后的力响应。A3显示在9AC和0.5μM LTG的存在下的力响应。A4显示当i LTG升高至8μM RUF

时的力响应。A5和A6显示当RUF进一步分别升高至18 μ M和144 μ M时的力响应。B显示等效线图,其描绘了在给定浓度的LTG的存在下消除50%最大AUC所需的RUF浓度。使用两种固定浓度的LTG确定RUF和LTG的协同效应:0.5 μ M (n=6) 和1 μ M (n=4)。短划线显示数据的最佳双曲线拟合,指示将与给定的LTG浓度一起使用的预期RUF浓度。实线指示在任何给定LTG浓度下的、如果药物纯粹以加和方式起作用所预期的RUF浓度。此线下方的数据点反映药物以协同方式起作用。

[0064] 图4

[0065] 图4显示肌强直和RUF或LTG对乳酸脱氢酶 (LDH) 释放的影响,该乳酸脱氢酶释放是来自大鼠EDL肌肉的损伤的间接量度。在所有情况下,在刺激前 (Pre) 取得样品,然后在30Hz、每3分钟0.2ms脉冲下刺激肌肉收缩2s,持续60min (20次刺激),或静置。空心符号来自与9AC \pm LTG或RUF孵育的肌肉。实心三角形来自与9AC孵育的肌肉,无刺激。在刺激停止后立即从孵育肌肉的溶液中取出新样品。在接下来的180分钟内,每30分钟从孵育溶液中取样,如刺激后的时间所指定的。从刺激停止到刺激后180分钟的时间称为恢复。

[0066] 图5

[0067] 图5显示以下两种化合物的示意图:化合物1 (5-氨基-1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺) 和化合物2 (1-苄基-5-甲基-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺),UPAC名称在每种化合物上方。B显示来自0.2ms脉冲下60Hz刺激2s的、与9AC孵育 (以通过阻断ClC-1通道诱导肌强直) 的大鼠比目鱼肌的相对曲线下面积 (AUC)。当肌强直充分发展 (100% AUC) 时,以渐增的浓度添加这些化合物,并且在各浓度下测试肌强直 (60Hz, 2s)。将来自实验的数据拟合为3参数S形函数,并且对于每块肌肉,所得拟合显示为实线。每种化合物都是在两块肌肉上进行测试。

[0068] 现在将在下文中更详细地描述本发明。

[0069] 发明详述

[0070] 定义

[0071] 在以进一步的细节讨论本发明之前,将首先定义下列术语和惯例:

[0072] 肌强直

[0073] 肌强直是以在自主收缩或电刺激之后骨骼肌的延迟松弛 (延长收缩) 为特征的极少数某些神经肌肉病症的症状。

[0074] 肌强直存在于先天性肌强直、高血钾性麻痹、低血钾性麻痹、先天性副肌强直以及肌强直性营养不良中。

[0075] 肌强直性营养不良

[0076] 肌强直性营养不良 (营养不良性肌强直,萎缩性肌强直) 是一种慢性的、缓慢进展的、高度可变的遗传性多系统疾病。它是一种常染色体显性疾病。其表征为肌肉消耗 (肌肉营养不良)、白内障、心脏传导缺陷、内分泌改变以及肌强直。

[0077] 有两种主要类型的肌强直性营养不良。1型肌强直性营养不良 (DM1),也称为Steinert病,具有严重的先天性形式和成人发病形式。2型肌强直性营养不良 (DM2),也称为近端肌强直性肌病 (PROMM),比DM1更罕见,并且一般表现为较轻微的体征和症状。肌强直性营养不良可发生在任何年龄的人群中。该疾病的两种形式均显示出常染色体显性遗传模式。DM1和DM2均具有成人发病的形式。

[0078] 先天性肌强直

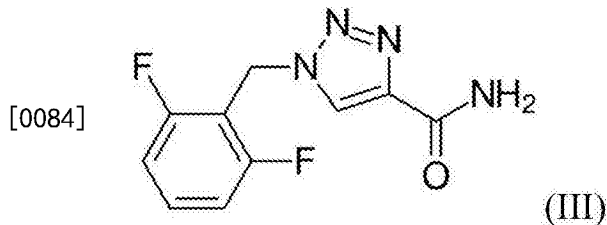
[0079] 先天的肌强直(也称先天性肌强直)是一种累及骨骼肌(用于运动的肌肉)的遗传性神经肌肉性通道病。该疾病的标志是开始收缩以终止的失败,通常称为肌肉延迟松弛(肌强直)和僵化。该疾病由编码ClC-1氯离子通道的基因(CLCN1)的部分突变引起,这些突变导致肌纤维膜对刺激(过度兴奋)具有异常过度的反应。症状包括自主收缩后肌肉延迟松弛(肌强直),并且可以包括僵硬、肥大(增大)、一些突变中的一过性无力以及痉挛。

[0080] 先天性副肌强直

[0081] 先天性副肌强直是由于SCN4A基因中的突变导致,该SCN4A基因编码骨骼肌纤维膜中的电压门控钠通道Nav1.4。突变可改变通道的动力学,使得通道无法正常失活,从而使自发性动作电位在自主活动已终止后发生,延长肌肉松弛,或者如果松弛被严重延长的话可能导致麻痹。

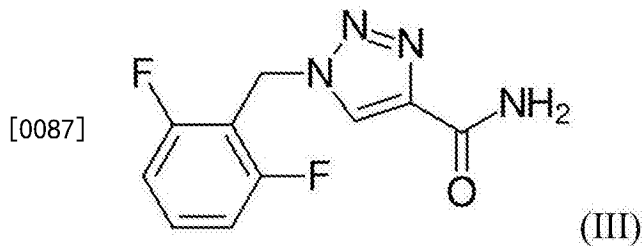
[0082] 卢非酰胺

[0083] 卢非酰胺(RUF)具有UPAC系统命名:1-(2,6-二氟苄基)-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺。卢非酰胺的商品名是Banzel(美国)和Inovelon(欧盟)。卢非酰胺也可通过化学式(III)以其化学结构描述:



[0085] 卢非酰胺是一种抗惊厥药物。它与其他药物和疗法联合使用来治疗Lennox-Gastaut综合征和各种其他发作性病症。

[0086] 因此,在一个实施方案中,卢非酰胺由化学式(III)给出:



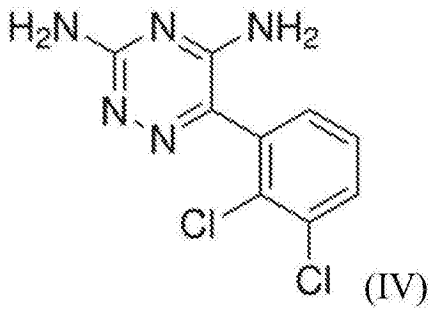
[0088] 在另一个实施方案中,卢非酰胺由以下化学式(UPAC)给出:

[0089] 1-(2,6-二氟苄基)-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺。

[0090] 拉莫三嗪

[0091] 拉莫三嗪(LTG)具有UPAC系统命名:6-(2,3-二氯苯基)-1,2,4-三嗪-3,5-二胺。拉莫三嗪也可通过化学式(IV)以其化学结构描述:

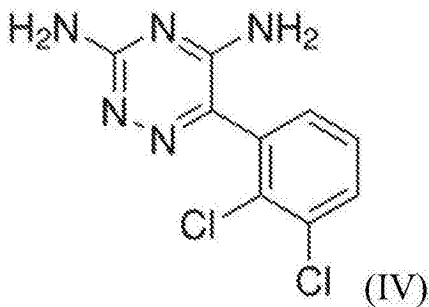
[0092]



[0093] 拉莫三嗪在世界大部分地区以“Lamictal”销售,拉莫三嗪是用于治疗癫痫和双相型障碍的抗惊厥药物。它也被用作标示外治疗临床抑郁症的辅助药物。对于癫痫,它用于治疗局灶性发作、原发性和继发性强直阵挛性发作以及与Lennox-Gastaut综合征相关联的发作。

[0094] 因此,在一个实施方案中,拉莫三嗪由化学式 (IV) 给出:

[0095]



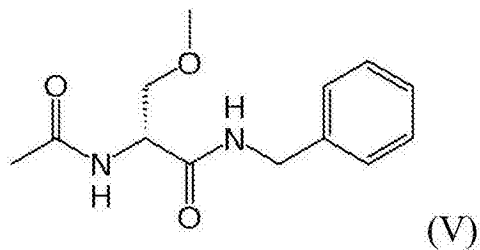
[0096] 在又一个实施方案中,拉莫三嗪由以下化学式 (UPAC) 给出:

[0097] 6-(2,3-二氯苯基)-1,2,4-三嗪-3,5-二胺。

[0098] 拉科酰胺

[0099] 拉科酰胺 (LCM) 具有UPAC系统命名: N^2 -乙酰基-N-苄基-D-高丝氨酰胺。拉科酰胺也可通过化学式 (V) 以其化学结构描述:

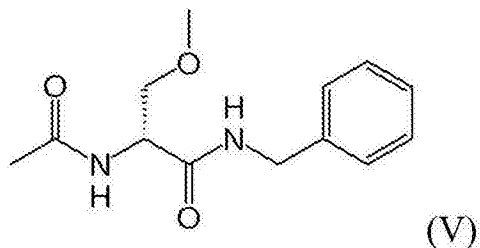
[0100]



[0101] 拉科酰胺 (LCM) (INN,以前称为erlosamide,harkeroside、SPM 927或ADD 234037) 是由比利时化学联盟 (Union Chimique Belge,UCB) 开发的药物,以商品名Vimpat销售,用于部分性发作和糖尿病性神经性疼痛的辅助治疗。

[0102] 因此,在一个实施方案中,拉科酰胺 (LCM) 由化学式 (V) 给出:

[0103]



[0104] 在又一个实施方案中,拉科酰胺 (LCM) 由以下化学式 (UPAC) 给出:

[0105] N²-乙酰基-N-苄基-D-高丝氨酸酰胺。

[0106] 治疗有效量

[0107] 在本发明的上下文中,术语“治疗有效量”涉及足以治疗肌强直或治疗或减轻与肌强直相关的症状的浓度或(每日)剂量。

[0108] Nav1.4电压门控钠通道

[0109] Nav1.4电压门控钠通道由SCN4A基因编码。基因突变与低血钾性周期性麻痹、高血钾性周期性麻痹、先天性副肌强直、和钾加重的肌强直相关联。

[0110] 其活性衍生物

[0111] 在本发明的上下文中,术语“其活性衍生物”涉及能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道的化合物。

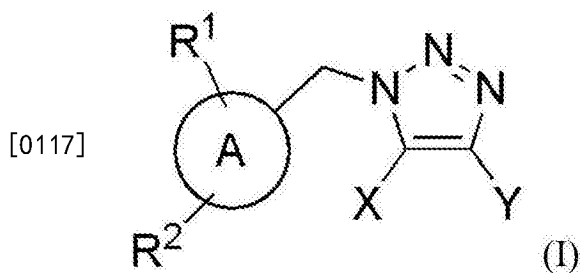
[0112] 讨论

[0113] 本研究旨在评价三种抗惊厥药物对来自大鼠和人的分离肌肉中的肌强直的作用。我们发现拉科酰胺(LCM)、拉莫三嗪(LTG)和卢非酰胺(RUF)均能够在其临床相关浓度范围内减少肌强直。然而,在临床观察的浓度范围内,LCM不能使肌强直降低超过60%±2%,而RUF和LTG均能使肌强直降低92%±2%。对LTG和RUF观察到对肌强直的明显协同作用。

[0114] 该研究还揭示,肌强直可以引起明显的肌肉损伤,并且该LTG和RUF可以预防这种肌强直诱导的损伤。这在从肌强直性肌肉中引起显著的LDH释放的肌强直中是明显的。LDH是临床上使用的肌肉损伤指标,并且在本研究中LDH伴随肌强直的升高明显表明肌强直可促成肌强直性营养不良中的肌肉损伤和消耗。因为RUF和LTG均能够消除肌强直和肌强直诱导的损伤,这表明RUF和LTG可以用于降低肌强直并由此降低肌强直性营养不良中的肌肉消耗。

[0115] 包含卢非酰胺的组合物用于治疗肌强直

[0116] 在第一方面,本发明涉及一种(药物)组合物,其包含根据式(I)的卢非酰胺或其活性衍生物:



[0118] 其中,

[0119] -A是芳基或杂芳基,

[0120] -R¹和R²独立地选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺,任选地R¹和/或R²是不存在的,

[0121] -X选自:氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺,

[0122] -Y选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

[0123] 该组合物用于

[0124] -治疗肌强直;和/或

[0125] -治疗或减轻与肌强直相关的症状;

[0126] 其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道。

[0127] 本发明的第二方面涉及一种包含卢非酰胺的(药物)组合物,其用于治疗肌强直;和/或治疗或减轻与肌强直相关的症状。

[0128] 如实施例1、2和4中所示,卢非酰胺(和拉莫三嗪和拉科酰胺)能够抑制大鼠和人体肌肉中的肌强直。

[0129] 在一个实施方案中,A选自:苯基、吡啶、嘧啶、哒嗪、吡嗪、吡咯、吡唑、咪唑、呋喃、和噻吩。在另一个实施方案中,A是苯基。

[0130] 在又一个实施方案中, R^1 和 R^2 在所述苯基的2-和6-(邻)位。在另外的实施方案中, R^1 和 R^2 选自卤素、甲基以及胺,优选卤素。在又另外的实施方案中, R^1 和 R^2 是氟。在一个具体实施方案中, R^1 和/或 R^2 不存在(参见实施例5),因此 R^1 和/或 R^2 是H。根据此具体实施方案,在又另外的实施方案中,该化合物是5-氨基-1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺或1-苄基-5-甲基-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺。

[0131] 在一个实施方案中,X选自:氢、卤素、甲基以及胺,优选氢。

[0132] 在另一个实施方案中,Y是甲酰胺,优选-C(O)NH₂。

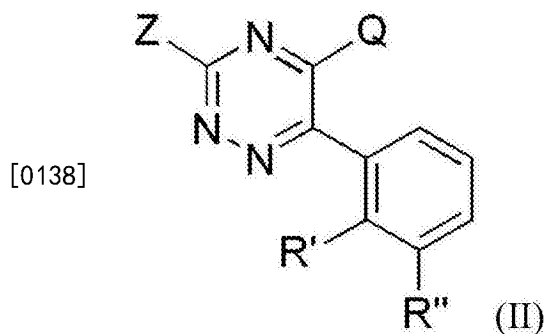
[0133] 在又一个实施方案中,任选的另外的取代基选自:卤素、甲基以及胺。

[0134] 在一个优选的实施方案中,使用的组合物包含卢非酰胺和/或式(I)的化合物是卢非酰胺。

[0135] 存在不同类型的肌强直。因此,在一个实施方案中,肌强直选自:先天性肌强直、先天性副肌强直、肌强直性高血钾性周期性麻痹(HPP)高血钾性低血钾性麻痹以及肌强直性营养不良。在另一个实施方案中,肌强直是先天性肌强直或肌强直性营养不良。在又一个实施方案中,肌强直选自:先天性肌强直、1型肌强直性营养不良以及2型肌强直性营养不良。

[0136] 不同类型的症状与肌强直相关联。因此,在一个实施方案中,所述症状选自:非自发肌肉收缩、肌肉僵硬、运动停滞、自主收缩后肌肉松弛延迟(肌强直)、肥大(增大)、一过性无力、肌肉损伤、肌肉萎缩、肌肉消耗以及痉挛,优选肌肉消耗。如实施例4中进一步所示,卢非酰胺和拉莫三嗪能够抑制大鼠模型中的肌肉损伤,其通过LDH的释放进行测试。损伤是消耗的前兆。

[0137] 该组合物可进一步包含其他药物。因此,在又一个实施方案中,使用的组合物进一步包含根据式(II)的拉莫三嗪或其活性衍生物



[0139] 其中,

[0140] -Z和Q独立地选自:卤素, C₁-C₅烷基, C₂-C₅烯基, C₂-C₅炔基, 任选经取代的酮, 任选

经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

[0141] -R' 和R'' 独立地选自:卤素,C₁-C₅烷基,C₂-C₅烯基,C₂-C₅炔基,任选经取代的酮,任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,任选地R' 和/或R'' 是不存在的,

[0142] 其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道。

[0143] 在一个实施方案中,Z和Q均是胺。

[0144] 在另一个实施方案中,R' 和R'' 是胺、甲基、或卤素。在又一个实施方案中,R' 和R'' 均是卤素。在另外的实施方案中,R' 和R'' 均是氯。在一个具体实施方案中,R' 和/或R'' 不存在(参见实施例5)。

[0145] 在又一个实施方案中,Z和Q均是胺,并且R' 和R'' 均是氯。

[0146] 在又一个实施方案中,任选的另外的取代基选自:卤素、甲基以及胺。

[0147] 在一个优选的实施方案中,式(I)的化合物是卢非酰胺,并且具有式(II)的化合物是拉莫三嗪。

[0148] 在又一个优选的实施方案中,当给予根据本发明的组合性组合物时实现的Nav1.4电压门控钠通道的组合抑制和/或调节大于当分开给予该式(I)的化合物和该式(II)的化合物时实现的抑制和/或调节的总和。简而言之,获得了协同效应。如实施例3中所示,通过使用等效线图,记录了卢非酰胺与拉莫三嗪之间明显的协同效应。

[0149] 在又一个实施方案中,组合物还包含拉科酰胺(LCM)或其活性衍生物,其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道。

[0150] 与肌强直相关的症状可来自不同的细胞缺陷。因此,在另外的实施方案中,与肌强直相关的症状与编码ClC-1氯离子通道的基因(CLCN1)突变和/或因ClC-1mRNA聚集导致的蛋白表达降低和/或表达ClC-1失败相关联。

[0151] 可以通过不同途径将组合物给予受试者。因此,在一个实施方案中,将组合物经口服、局部、皮下或静脉给予。优选地,组合物例如以片剂形式口服给药。应理解,受试者优选是哺乳动物,且最优选是人。

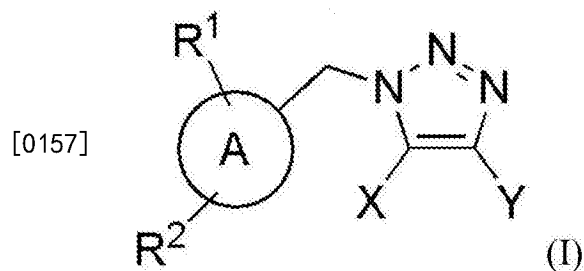
[0152] 卢非酰胺的每日剂量可变化。因此,在又另外的实施方案中,使用的组合物包含治疗有效量的卢非酰胺或其活性衍生物,该治疗有效量例如以每日剂量计在以下范围内:10-7200mg/天,例如400-3600mg/天,例如100-2100mg/天或例如1600-7200mg/天。

[0153] 可以进一步优化该组合物。因此,在一个实施方案中,使用的组合物进一步包含药学上可接受的辅料、稀释剂、和/或载体。

[0154] 包含卢非酰胺和拉莫三嗪的组合物

[0155] 如实施例3所示,公开了卢非酰胺和拉莫三嗪在治疗肌强直中的出人意料的协同效应。因此,本发明的另一方面涉及(组合性)组合物,其包含

[0156] -根据式(I)的卢非酰胺或其活性衍生物:



[0158] 其中，

[0159] -A是芳基或杂芳基，

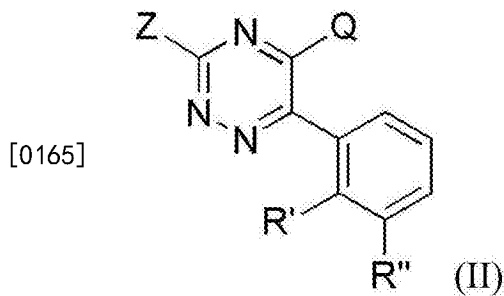
[0160] -R¹和R²独立地选自：卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，任选地R¹和/或R²是不存在的，

[0161] -X选自：氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺，

[0162] -Y选自：卤素，C₁-C₅烷基，C₂-C₅烯基，C₂-C₅炔基，任选经取代的酮，任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

[0163] 以及

[0164] 根据式 (II) 的拉莫三嗪或其活性衍生物



[0166] 其中，

[0167] -Z和Q独立地选自：卤素，C₁-C₅烷基，C₂-C₅烯基，C₂-C₅炔基，任选经取代的酮，任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，

[0168] -R' 和R'' 独立地选自：卤素，C₁-C₅烷基，C₂-C₅烯基，C₂-C₅炔基，任选经取代的酮，任选经取代的醛，以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺，任选地R' 和/或R'' 是不存在的，

[0169] 其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道。

[0170] 当然应理解，可以如前面对本发明的前述方面所定义的那样对A、X、Y、Z、N、Q、R' 和R'' 进行选择。

[0171] 另外的方面涉及用作药物的此组合性组合物。在又另外的方面，涉及用于治疗肌强直和/或治疗或减轻与肌强直相关的症状的此组合性组合物。

[0172] 又另外的方面涉及此组合性组合物，其还包含药学上可接受的辅料、稀释剂、和/或载体。

[0173] 一个实施方案还涉及根据本发明的组合性组合物，其包含

[0174] -治疗有效量的根据式 (I) 的卢非酰胺或其活性衍生物；以及

[0175] -治疗有效量的根据式 (II) 的拉莫三嗪或其活性衍生物。

[0176] 在又一个实施方案中，治疗有效量足以治疗肌强直或者治疗或减轻与肌强直相关的症状。症状如前所述。

[0177] 本发明的更具体的实施方案涉及根据本发明的组合性

[0178] 组合物，其包含

[0179] -5-7200mg的根据式 (I) 的卢非酰胺或其活性衍生物；以及

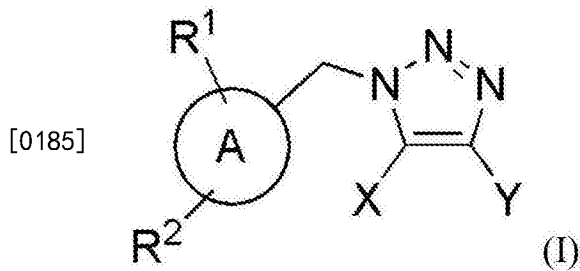
[0180] -5-800mg的根据式 (II) 的拉莫三嗪或其活性衍生物。

[0181] 多组分试剂盒

[0182] 组合性治疗可以是同时或以任何顺序给予以实现如上所概述的所希望的治疗。

[0183] 因此,本发明的又一个方面涉及多组分试剂盒,其包含

[0184] 第一组合物,该第一组合物包含根据式 (I) 的卢非酰胺或其活性衍生物:



[0186] 其中,

[0187] -A是芳基或杂芳基,

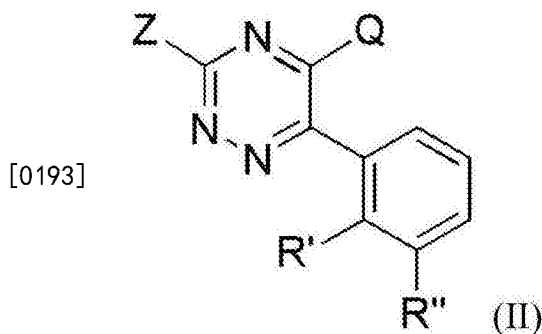
[0188] -R¹和R²独立地选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺,任选地R¹和/或R²是不存在的,

[0189] -X选自:氢、卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛以及任选经取代的胺,

[0190] -Y选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

[0191] 以及

[0192] 第二组合物,该第二组合物包含根据式 (II) 的拉莫三嗪或其活性衍生物



[0194] 其中,

[0195] -Z和Q独立地选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,

[0196] -R' 和R'' 独立地选自:卤素、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基、任选经取代的酮、任选经取代的醛,以及任选经取代的胺、羧酸以及羧酰胺,任选地R' 和/或R'' 是不存在的,

[0197] 其中所述其活性衍生物能够抑制和/或调节Nav1.4电压门控钠通道,

[0198] 用于治疗肌强直;和/或治疗或减轻与肌强直相关的症状。

[0199] 当然应理解,可以如前面对本发明的前述方面所定义的那样对A、X、Y、Z、N、Q、R' 和R'' 进行选择。

[0200] 在一个优选的实施方案中,式 (I) 的化合物是卢非酰胺,并且具有式 (II) 的化合物是拉莫三嗪。

[0201] 应注意,在本发明的这些方面之一的上下文中描述的实施方案和特征也适用于本发明的其他方面。具体而言,这涉及所描述的化学式和可能的取代基。

[0202] 在本申请中引用的全部专利和非专利参考文件通过引用以其全部内容结合在此。

[0203] 本发明现在将在下列非限制性实施例中进行进一步详细描述。

实施例

[0204] 实施例1

[0205] 目的

[0206] 测试卢非酰胺 (RUF)、拉莫三嗪 (LTG) 和拉科酰胺 (LCM) 是否可以消除大鼠比目鱼肌中ClC-1抑制所诱导的肌强直。

[0207] 方法

[0208] 动物处理

[0209] 没有实验是在活体动物上进行的,并且动物的所有处理和杀死均依照丹麦动物福利法规和奥胡斯大学的当地动物处理准则。在从Janvier实验室获得的年幼的4周龄雄性/雌性Wistar大鼠 (65-75g) 解剖后,在比目鱼肌中测量收缩力。所有动物随意喂食并保持在恒温 (21°C) 和白天长度 (12h)。

[0210] 溶液和化合物

[0211] 用于在实验期间孵育的标准Krebs-Ringer溶液包含 (mM) :122NaCl、25NaHCO₃、2.8KCl、1.2KH₂PO₄、0.6MgSO₄、1.27CaCl₂以及5D-葡萄糖。在所有实验中,将溶液保持在30°C并用95%O₂和5%CO₂的混合物平衡 (pH~7.4)。为了诱导实验性肌强直,将溶解在DMSO (西格玛奥德里奇 (Sigma Aldrich), 丹麦) 中的100μM ClC-1通道抑制剂9-苄-甲酸 (9AC) (西格玛奥德里奇, 丹麦) 添加至孵育溶液中。最终的DMSO浓度从未超过0.35%。

[0212] 收缩力的测量

[0213] 使用先前已详细描述的实验设置 (Skov M, Riisager A, Fraser JA, Nielsen OB, Pedersen TH. Extracellular magnesium and calcium reduce myotonia in ClC-1 inhibited rat muscle. *Neuromuscular Disorders* 2013 06;23 (6):489-502) 来记录肌肉的等长收缩过程中产生的力。简言之,跨肌肉中央部分的场刺激 (0.2ms脉冲, 24-30V/cm) 用于触发收缩活动。在实验室中开始孵育时,将肌肉拉伸至导致最大主动颤搐力 (2Hz) 的长度。在所有实验中,每10min对肌肉以15Hz刺激2s。为了量化肌肉的强直性行为,包括增加的力和延长的松弛,对于每次收缩确定主动力响应的力-时间积分 (曲线下面积, AUC), 其中主动力被计算为停止电刺激后总力与静息力之间的差值。为了评估LCM、RUF和LTG对肌强直的影响,使用力响应的尾AUC。这对应于从停止刺激诱导的收缩直至完全松弛的AUC (参见实施例1中的图1)。为了确定肌强直与药物之间的剂量-反应关系,将肌肉与9AC孵育并刺激直至形成稳定的肌强直表型 (通常5-7次刺激)。然后在递增的药物浓度下孵育肌肉,其中每个药物浓度测试至少30min (三次刺激),之后进一步增加浓度。在测试药物组合的实验中,在评价药物的作用之前,将肌肉在每个药物组合下温育30min。在此之后,进一步增加药物浓度。

[0214] 统计分析

[0215] 所有的数据平均值均以均值和SEM表示。针对成对或不成对的观察结果 (在适当时),使用学生双尾t检验 (Student's two-tailed t test) 来确定两个数据组之间的统计学显著性差异。单因素方差分析 (ANOVA) 用于多于两个数据组的比较,采用Holm-Sidak事后检验以检测各组之间的显著差异。P值小于0.05被视为指示测试组之间具有显著差异。将来自剂量反应实验的数据拟合成3参数S形函数以获得抑制一半肌强直的浓度 (EC₅₀, 表1)。

[0216] 结果

[0217] 分离的大鼠比目鱼肌

[0218] 为了首先测试三种药物 (RUF、LCM和LTG) 对非肌强直性大鼠比目鱼肌中的力的作用,在三个小时的药物孵育期间将肌肉每10分钟暴露于5Hz和60Hz下的2s刺激。药物浓度是临床上耐受的最高游离浓度:对于5Hz和60Hz刺激二者,与5 μ M LCM一起孵育使两块肌肉中的力减少~6%-8%。在三块肌肉中,采用25 μ M LTG的情况下,力减少~6%,并且在三块肌肉中,采用100 μ M RUF的情况下,力减少4%。在所有情况下,三小时期间力的这些减少与在时间匹配的对照肌肉中观察到的减少相似。

[0219] 在评价RUF、LCM和LTG对肌强直作用的第一系列实验中,通过将肌肉与100 μ M的C1C-1通道阻断剂9AC一起孵育或通过将溶液浴中的Cl⁻浓度降低至30 (n=8) 或10 (n=8) mM (大鼠比目鱼肌,LCM处理) 来诱导肌强直表型。采取这些降低C1C-1功能的途径模拟先天性肌强直和肌强直性营养不良中的C1C-1功能障碍。因此,与9AC一起孵育或降低Cl⁻浓度导致明显的松弛延长,并且当在15Hz下刺激2s时增加最大力,如图1所例示 (A1、B1和C1对比A2、B2和C2)。向孵育溶液添加2 μ M LCM使AUC降低~40%,图1 (A2对比A3)。将LCM浓度增加至5 μ M可将AUC再降低~20% (图1,A4)。同样,向9AC处理的肌肉中添加20 μ M RUF使AUC降低大于50% (图1,B2对比B3),当RUF浓度增加至100 μ M时,AUC降低~98% (图1,B4)。最后,添加2 μ M LTG使AUC降低~46% (图1,C3),并且当LTG浓度增加至16 μ M时,AUC降低~98% (图1,C4)。所有三种抗惊厥剂 (药物) 如果其浓度充分增加则能够完全消除肌强直。为了量化药物对肌强直的剂量依赖性,将不同药物浓度下的AUC针对药物浓度作图,并且在图1D、1E和1F中分别针对LCM、RUF和LTG示出所得到的每种药物药物浓度对肌强直程度的图。图1D-1F示出针对每个治疗组中的单独肌肉,将数据拟合成3参数S形方程所得的曲线。在涵盖整个临床范围 (以 μ M计) 的浓度下测试药物;LCM为从0.5到80,LTG为从0.5到32,并且RUF为从0.5到120。在每个测试的单个肌肉中,随着药物浓度的增加AUC下降。对于每种药物,在表1中列出将AUC降低至最大值的50% (EC₅₀) 所需的浓度。

[0220] 表1:

[0221]

大鼠	药物	EC ₅₀	拟合斜率
n=20	拉科酰胺	5.02±0.41	-0.46±0.031
n=10	拉莫三嗪	1.52±0.13	-0.39±0.042
n=10	卢非酰胺	18.06±1.84	-0.29±0.02

[0222] 结论

[0223] 总的来说,这些结果显示,在大鼠模型中三种抗惊厥剂 (拉科酰胺、拉莫三嗪和卢非酰胺) 能够以剂量依赖性方式完全消除肌强直。

[0224] 实施例2

[0225] 目的

[0226] 研究三种抗惊厥药物 (卢非酰胺 (RUF)、拉莫三嗪 (LTG) 和拉科酰胺 (LCM)) 能否降低人体肌肉中的肌强直。

[0227] 方法

[0228] 人体组织

[0229] 人体肌肉的使用得到了丹麦伦理委员会(中日德兰大区(Region Midtjylland), 第一委员会)(参考号1-10-72-20-13)的批准,并按照赫尔辛基宣言(Helsinki Declaration)进行。纳入前从所有受试者获得知情同意书。肌肉获得自在Skejby医院承认与计划进行主动脉瘤手术相关的4名男性受试者。如早前所述进行受试者组织的分离(Skov M, De Paoli FV, Lausten J, Nielsen OB, Pedersen TH. Extracellular magnesium and calcium reduce myotonia in isolated ClC-1 chloride channel-inhibited human muscle. Muscle Nerve. 2015 Jan; 51(1):65-71)。分离后,将组织在5°C在基于HEPES的溶液(pH 7.4)中运输到大学的实验室(<30min)。抵达实验室后,将组织孵育于经常更换的新鲜Krebs-Ringer碳酸氢盐溶液中,该溶液用氧气中的5%CO₂于30°C平衡10-20min,之后进一步解剖成大约4cm长、515±61mg重的较小的肌束。对于收缩实验,用聚酯绳将肌束的两端绑住,以使能将制品安装在用于测量收缩力的设置中。

[0230] 溶液、收缩设置、数据分析和统计

[0231] 如实施例1所述。

[0232] 结果

[0233] 对人腹肌的小肌束重复图1中的实验。使用9AC诱导肌强直,并且随后以渐增的浓度添加LCM、RUF或LTG。在所有情况下,随着药物浓度的增加,肌强直降低。图2A显示了在暴露于RUF之前和之后,以15Hz刺激2s的分离人体肌肉的单个肌束的迹线。通过与100μM 9AC孵育来诱导肌强直,并且随后添加RUF逐渐降低肌强直,在80μM下几乎完全消除肌强直。用LCM和LTG处理的人肌束获得类似的迹线。图2B-2D显示了分别添加了LCM(n=5)、RUF(n=5)以及LTG(n=6)的单独束的数据和S形拟合。对于每种药物,在表2中列出将AUC降低至最大值的50%(EC₅₀)所需的浓度。

[0234] 表2:

[0235]

人	药物	EC ₅₀	临床最大剂量 (μM)	拟合斜率
n = 5	拉科酰胺	9.24 ± 2.54	5.7	-0.44 ± 0.047
n = 6	拉莫三嗪	5.54 ± 0.88	25	-0.30 ± 0.068
n = 4	卢非酰胺	22.47 ± 1.73	100	-0.33 ± 0.035

[0236] 结论

[0237] 总的来说,这些结果显示,三种抗惊厥剂(拉考酰胺、拉莫三嗪和卢非酰胺)能够以剂量依赖性方式完全消除在分离的人体肌肉中的肌强直。

[0238] 实施例3

[0239] 目的

[0240] 确定药物是否对肌强直具有加和或协同效应。

[0241] 方法

[0242] 如实施例1中所述。

[0243] 结果

[0244] 组合药物的效果

[0245] 卢非酰胺、拉莫三嗪和拉科酰胺在患者中观察到的游离血清浓度内的浓度下均降低了肌强直。然而,虽然拉科酰胺必须升高至高于临床上接受的浓度才能消除肌强直,但消除肌强直所需的拉莫三嗪和卢非酰胺的浓度良好地在临床上接受的范围内。

[0246] 为了确定当组合药物时是否可以观察到加和或协同效应,接下来进行以下采用药物组合的实验:LCM-RUF、LCM-LTG、LTG-RUF以及所有三种一起。在所有这些实验中,使用大鼠比目鱼肌。

[0247] 与单独使用任一药物相似,使用任何药物组合时均观察到AUC显著降低。因此,通过将2 μ M LCM与9 μ M RUF组合,其大致相当于这些药物的EC₅₀值(表1)的一半,分离的肌强直肌肉的AUC降低了58% \pm 9%。当浓度升高至4 μ M LCM和18 μ M RUF时,AUC降低88% \pm 1.3%,并且当浓度最终升高至其EC₅₀值的150%时,AUC降低95% \pm 0.45%。同样,与4 μ M LCM和1.5 μ M LTG的孵育导致AUC降低79% \pm 3.6%,并且与1.5 μ M LTG和18 μ M RUF孵育时AUC降低74 \pm 6.9%。当在每种药物的EC₅₀值下将肌肉与所有三种药物孵育时,AUC降低87% \pm 2.1%。

[0248] 为了测试RUF和LTG的协同效应,进行了一系列实验,以确定药物等效线图。在这些实验中,将大鼠比目鱼肌首先暴露于9AC以诱导肌强直表型(图3,A1对比A2)。然后添加0.5 μ M LTG,并且这导致AUC略微降低至完全肌强直状态的90%(图3,A2对比A3)。接着使肌肉经受渐增浓度的RUF以确定在低浓度LTG(0.5 μ M LTG)的这些条件下的EC₅₀值。图3A4显示,在0.5 μ M LTG时,RUF浓度仅需要升高至7 μ M RUF,以使AUC降低50%。还用1 μ M LTG预孵育进行了这样的实验,并且在这些条件下,3.1 μ M RUF足以将AUC降低50%。为了确定LTG和RUF的组合作用是否可以被认为是协同的,使用这些观察结果构建等效线图(Tallarida RJ.Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism.J.Pharmacol.Exp.Ther (US,2012) Jul;342 (1) 2-8.) 在此类图中,横坐标和纵坐标标示出两种研究药物的药物浓度。将单独给药时药物的EC₅₀用单线连接。此线被视为反映如果药物只是有加和作用,则将具有一半效应的药物浓度。线下方区域反映药物组合的协同药物效应,而线上方区域反映拮抗药物相互作用。从图3B可以看出,0.5 μ M LTG下7 μ M RUF事实上比如果RUF和LTG有纯粹加和作用时所预期的值低5 μ M,并且在1 μ M LTG下3.1 μ M RUF比通过加和性假定预测的值低3 μ M。

[0249] 因此,在两种情况下,达到一半效应需要添加的RUF浓度为如果药物具有加和作用模式时所预期浓度的大约50%。这清楚地表明,LTG和RUF在抑制肌强直方面起协同作用。

[0250] 结论

[0251] 呈现的数据显示拉莫三嗪和卢非酰胺协同作用于肌强直抑制。

[0252] 实施例4

[0253] 目的

[0254] 确定卢非酰胺和拉莫三嗪对肌肉损伤的影响,肌肉损伤可以诱导体内消耗。

[0255] 方法

[0256] LDH释放测量

[0257] 将EDL肌肉从大鼠分离并放置在如先前详细描述的进行氧合的小室中(Gissel H1,Clausen T.Excitation-induced Ca(2+)influx in rat soleus and EDL muscle:mechanisms and effects on cellular integrity.Am J Physiol Regul Integr Comp

Physiol.2000 279 (3) :R917-24)。

[0258] 结果

[0259] 研究肌强直对肌纤维完整性的影响和药物对肌纤维完整性的影响,在收缩的EDL肌肉中测定来自肌肉的胞内蛋白乳酸脱氢酶(LDH)到孵育溶液的释放。每5min对肌肉以15Hz、0.2ms脉冲刺激2s,持续60min(12次刺激),并且在收缩前和收缩后3小时内测定释放的LDH。

[0260] 如图4清晰所示,如果肌肉已经被9AC导致肌强直,LDH从肌肉的释放仅在刺激后增加,并且这种肌强直诱导的LDH释放可以被RUF完全阻断。采用LTG时观察到非常相似的作用。

[0261] 结论

[0262] 呈现的数据显示卢非酰胺和拉莫三嗪能够抑制LDH释放,从而清晰地指示这些药物可以预防肌肉损伤,肌肉损伤是体内肌肉消耗的前兆。

[0263] 实施例5

[0264] 目的

[0265] 确定卢非酰胺的类似物是否具有抗肌强直作用:

[0266] 化合物的UPAC化学式名称:

[0267] (1):5-氨基-1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺

[0268] (2):1-苄基-5-甲基-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺

[0269] 化合物示于图5中。

[0270] 方法

[0271] 如实施例1中所述。

[0272] 结果

[0273] 在分离的大鼠比目鱼肌中,通过将肌肉与100 μ M的ClC-1通道阻断剂9AC孵育并且每10min以15Hz、0.2ms脉冲刺激肌肉2s来诱导肌强直表型。在已发展肌强直后,将肌肉在递增浓度的两种化合物1和2下孵育。所得到的AUC降低显示在图5B中。两种化合物均能够完全消除肌强直。化合物的EC₅₀值是:化合物1为24.7 μ M,以及化合物2为19.1 μ M。

[0274] 结论

[0275] 呈现的数据显示卢非酰胺的两种类似物均能够以与卢非酰胺类似的剂量依赖性方式降低肌强直。

[0276] 缩写

[0277] 9AC,9-葱甲酸;

[0278] AUC,曲线下面积;

[0279] LCM,拉科酰胺,[(2R)-2-乙酰胺基-N-苄基-3-甲氧基-丙酰胺];

[0280] LTG,拉莫三嗪,[6-(2,3-二氯苄基)-1,2,4-三嗪-3,5-二胺];

[0281] RUF,卢非酰胺,[1-(2,6-二氟苄基)-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺]。

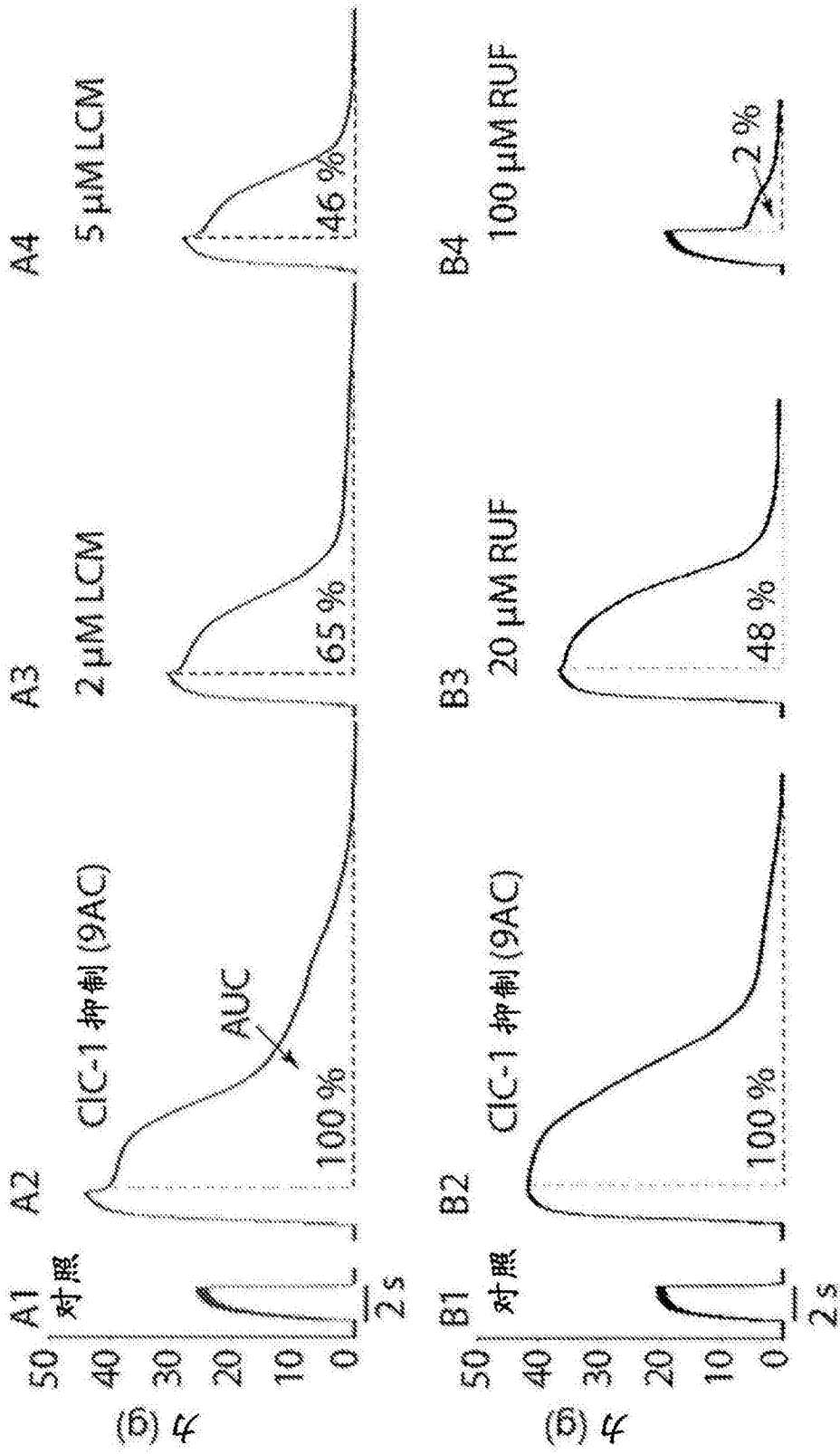


图1

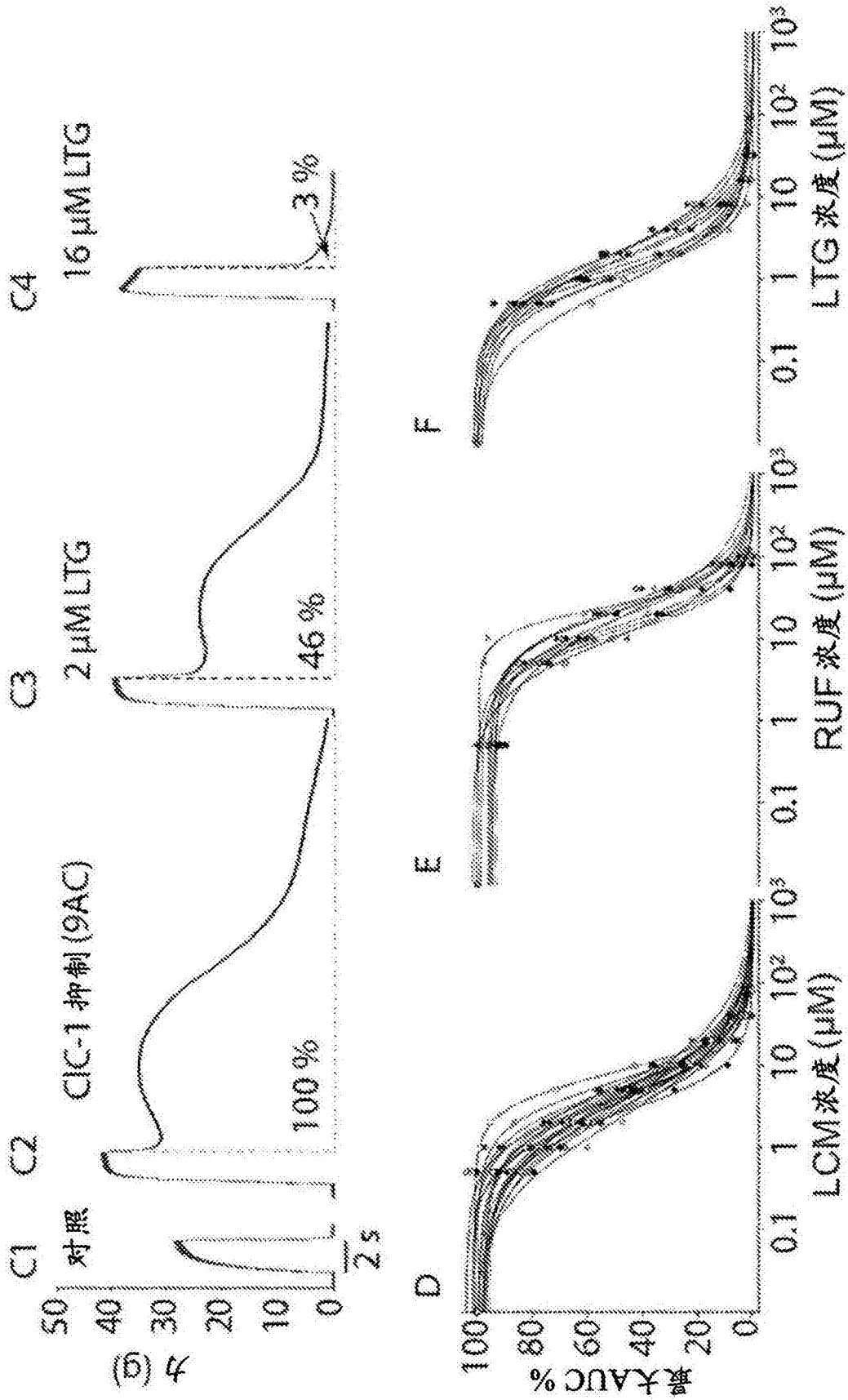


图1续

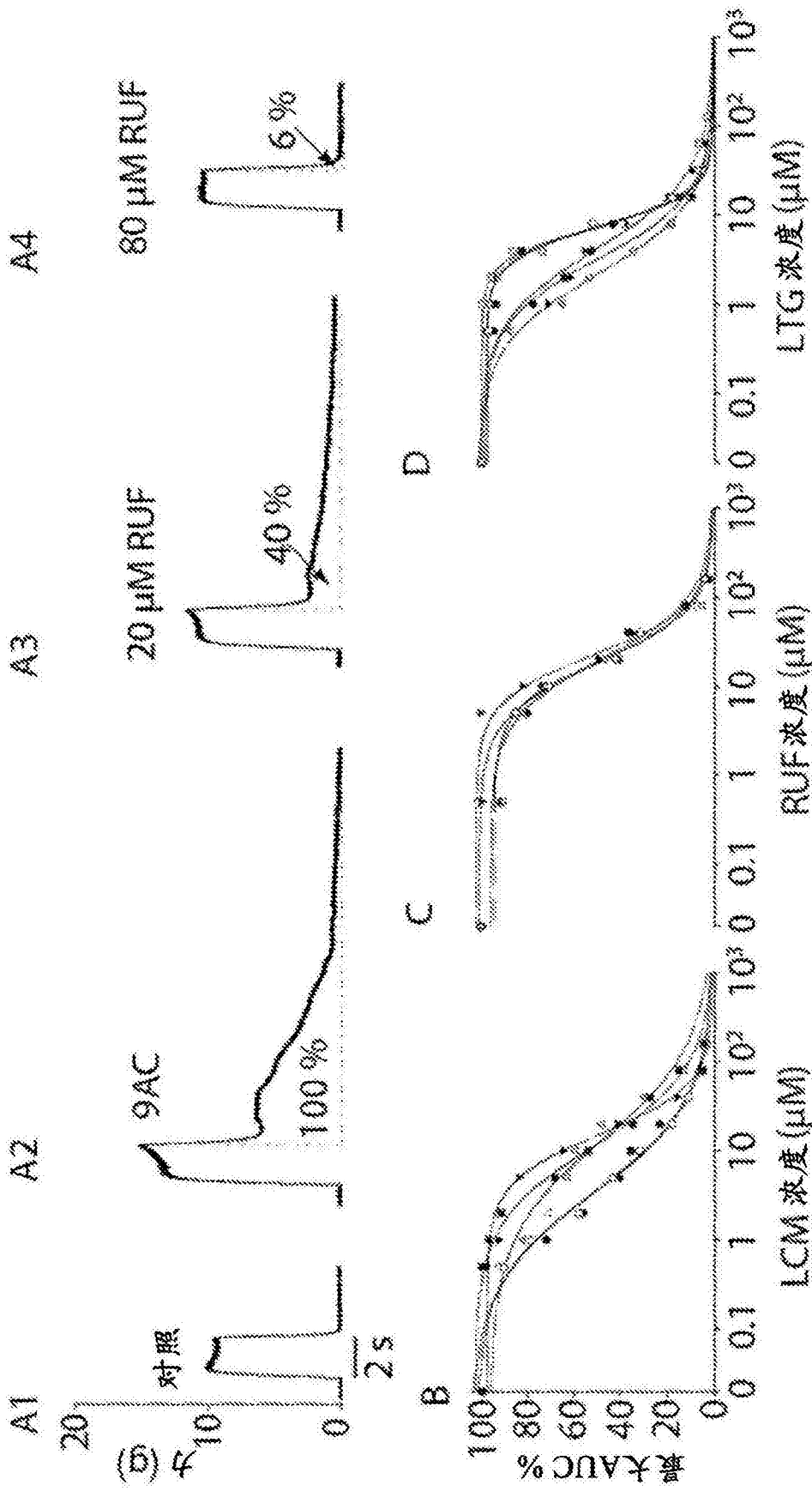


图2

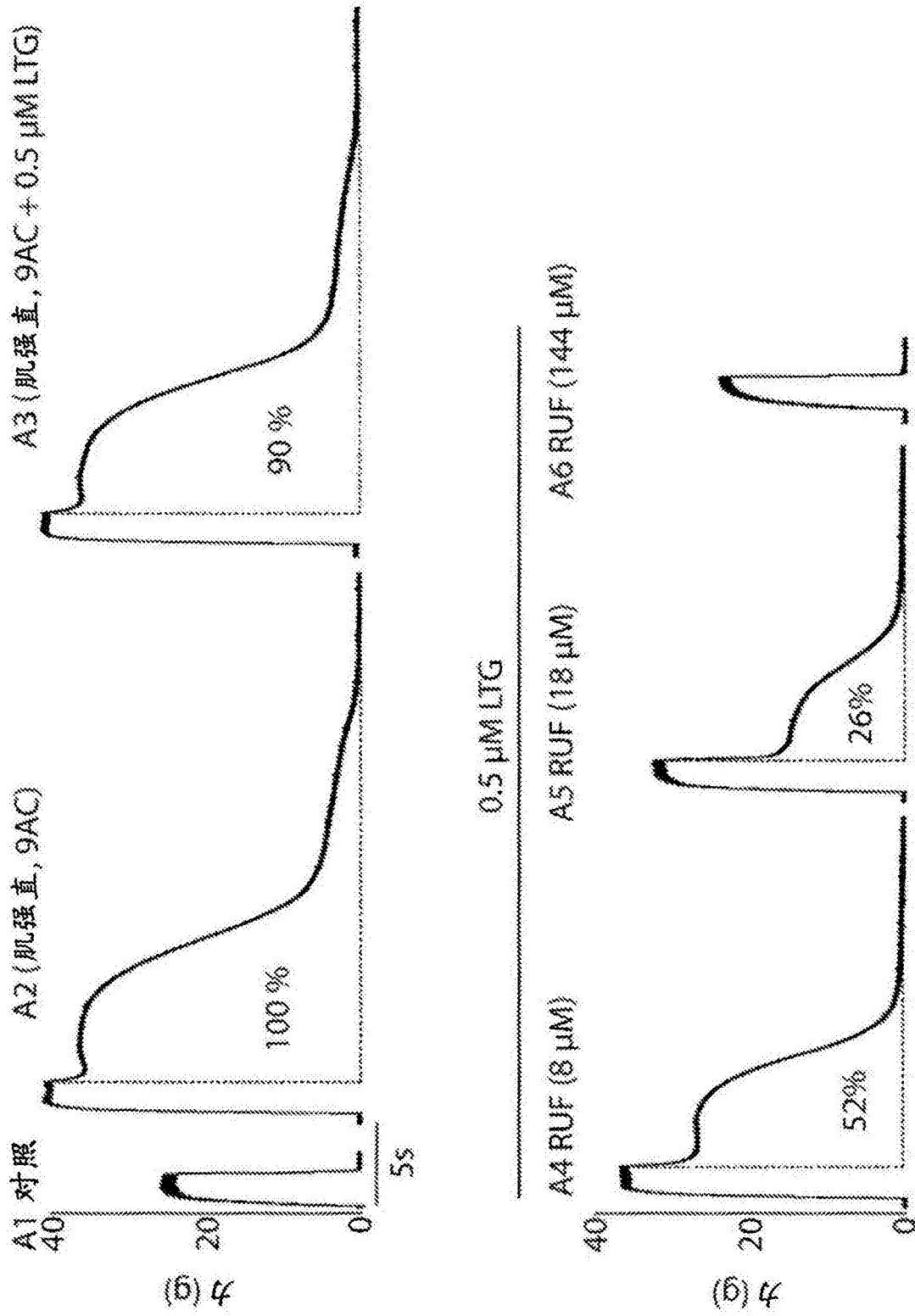


图3

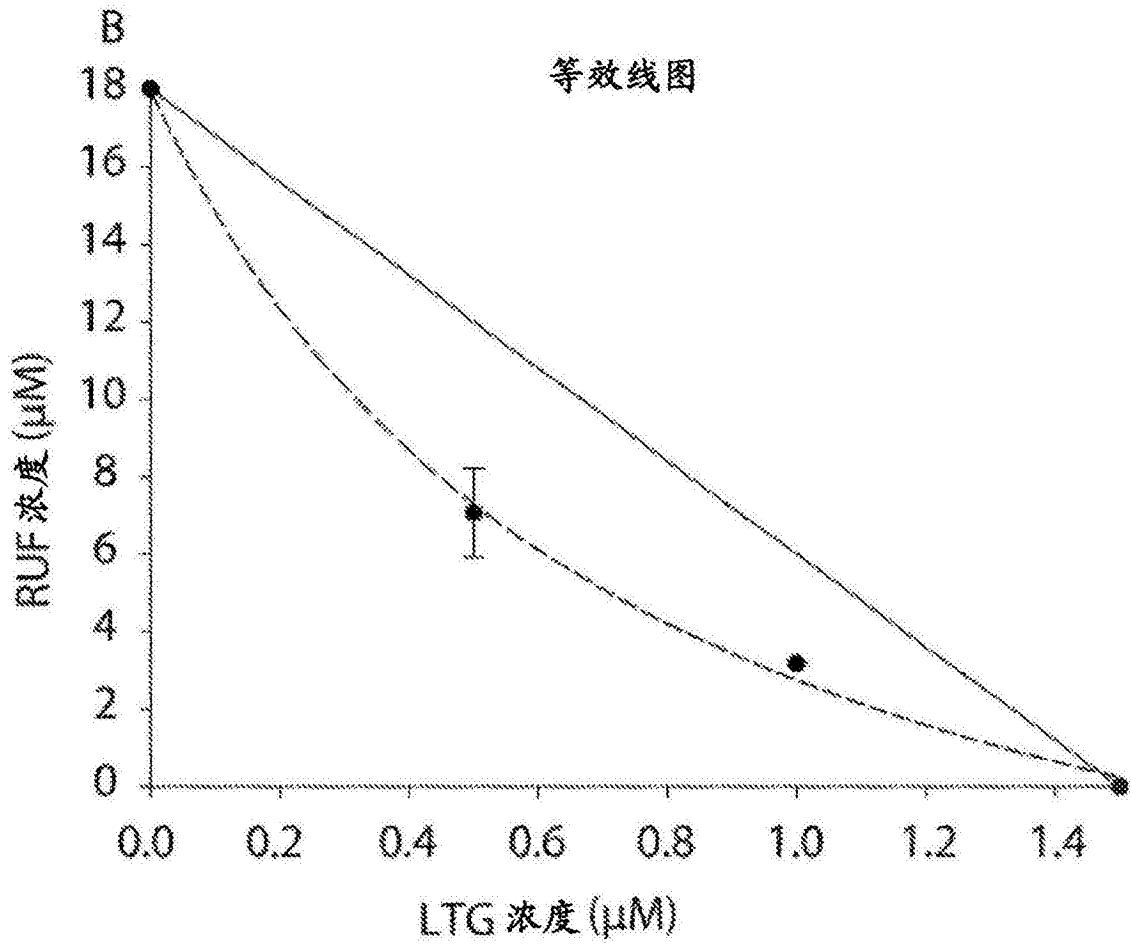


图3续

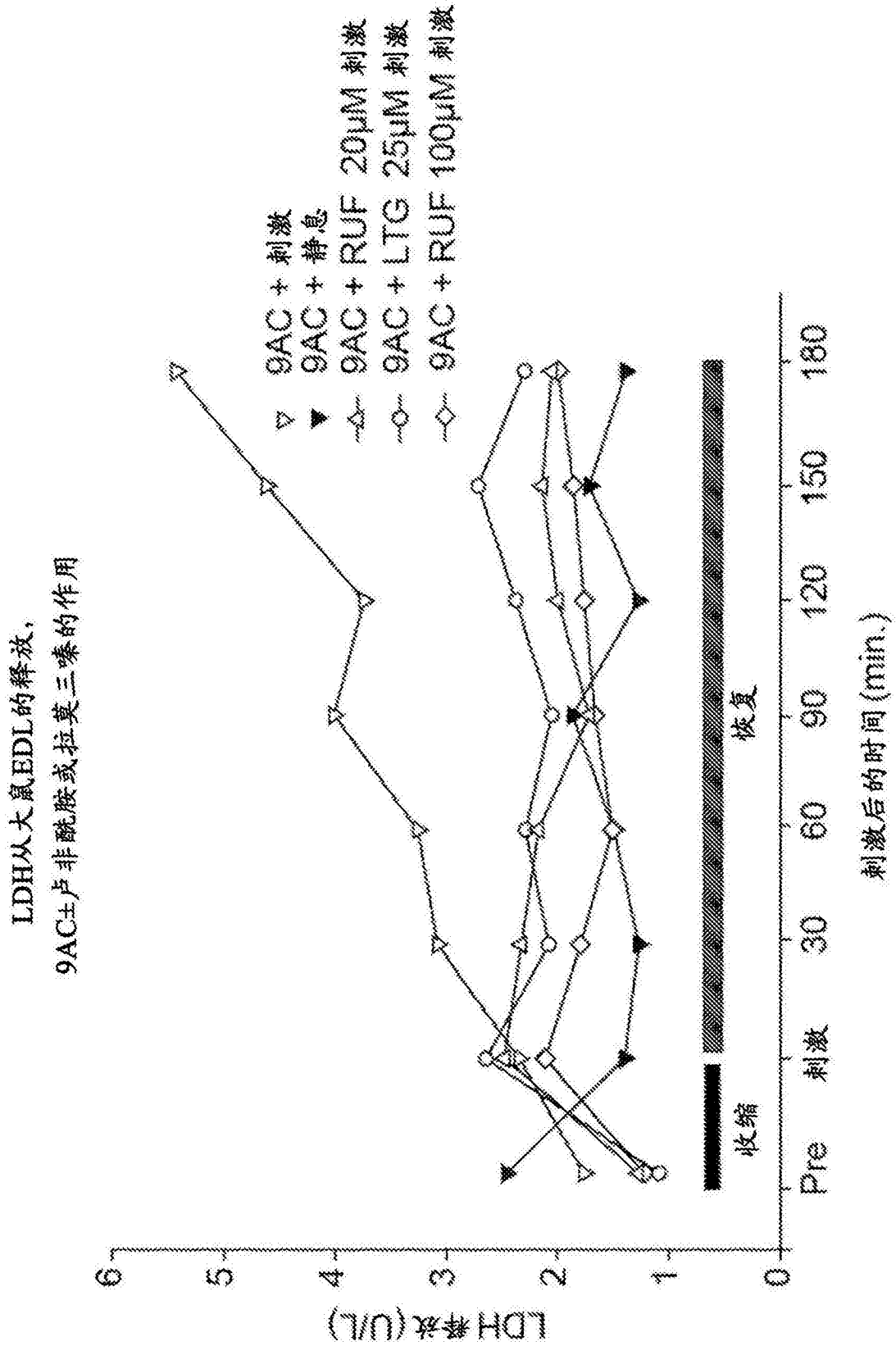
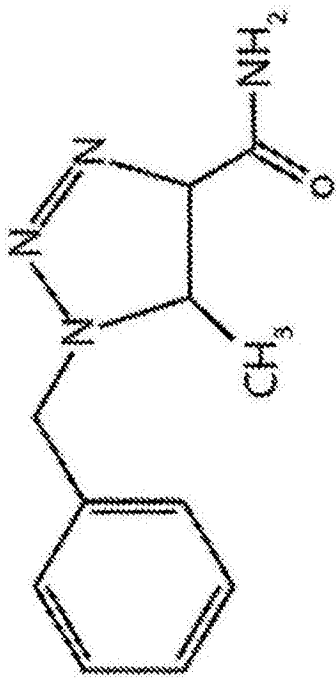


图4

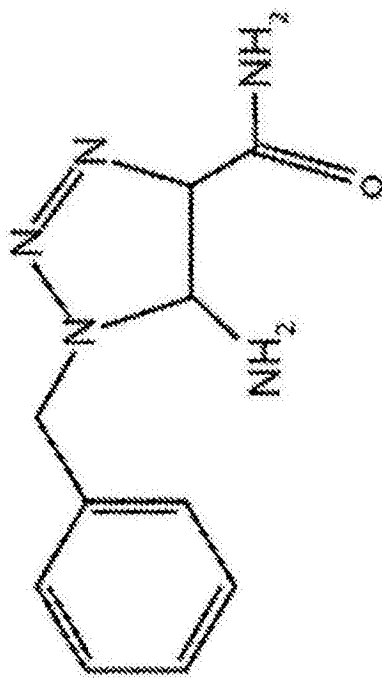
A

5-氨基-1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺



化合物 1

1-苄基-5-甲基-1H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺



化合物 2

图5

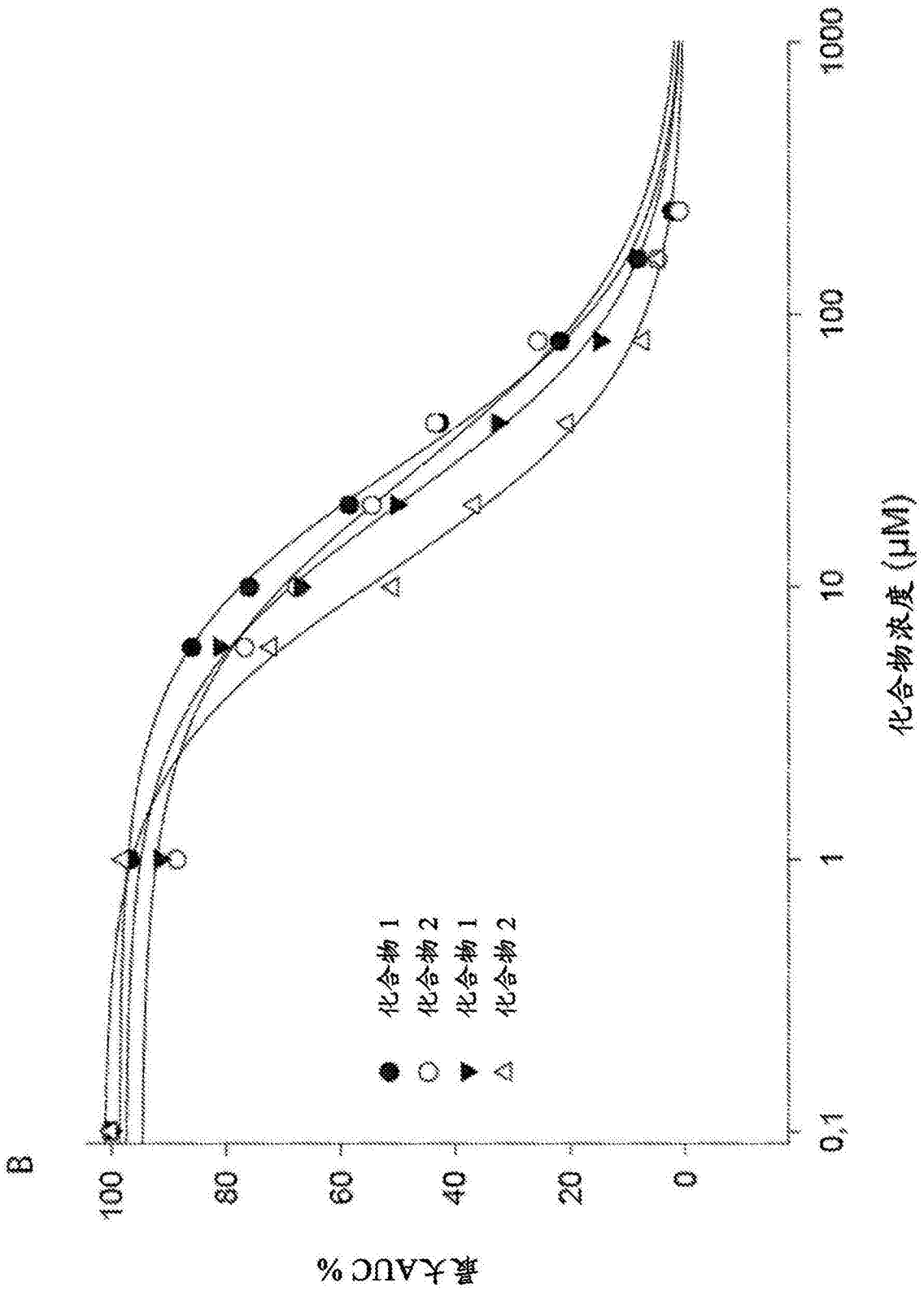


图5续